

PEPTIDE HAVING FUNCTION OF SUPPRESSING TRANSCRIPTION OF GENE

Patent number: JP2001292777
Publication date: 2001-10-23
Inventor: TAKAGI MASARU; SHINSHI HIDEAKI; OTA MASARU
Applicant: NATL INST OF ADVANCED INDUSTRIAL SCIENCE & TECHNOLOGY METI
Classification:
- international: C12N15/09; C07K14/415; C12N5/10
- european:
Application number: JP20000109765 20000411
Priority number(s):

Abstract of JP2001292777

PROBLEM TO BE SOLVED: To provide a peptide derived from a higher plant having a function of suppressing the transcription of a gene by binding to a DNA, a gene encoding the peptide, a recombination vector containing the gene, and a transformant containing the recombination vector.
SOLUTION: This peptide is (a) a peptide having a specific amino acid sequence or (b) a peptide that was modified by deleting, substituting or adding one amino acid or more from, in or to the amino acid sequence in the peptide (a) and has a function of suppressing the transcription of the gene.

Data supplied from the *esp@cenet* database - Patent Abstracts of Japan

BEST AVAILABLE COPY

(19) 日本国特許庁 (J P)

(12) 公開特許公報 (A)

(11) 特許出願公開番号
特開2001-292777
(P2001-292777A)

(43) 公開日 平成13年10月23日 (2001. 10. 23)

(51) Int.Cl. ⁷	識別記号	F I	テームコード* (参考)
C 1 2 N 15/09	Z N A	C 0 7 K 14/415	4 B 0 2 4
C 0 7 K 14/415		C 1 2 R 1:91)	4 B 0 6 5
C 1 2 N 5/10		C 1 2 N 15/00	Z N A A 4 H 0 4 5
// (C 1 2 N 15/09	Z N A	5/00	C
C 1 2 R 1:91)		C 1 2 R 1:91)	
審査請求 有 請求項の数 5 O L (全 12 頁)			

(21) 出願番号 特願2000-109765(P2000-109765)

(22) 出願日 平成12年4月11日 (2000. 4. 11)

(71) 出願人 301000011

経済産業省産業技術総合研究所長
東京都千代田区霞が関1丁目3番1号

(72) 発明者 高木 優

茨城県つくば市東1丁目1番3号 工業技
術院生命工学工業技術研究所内

(72) 発明者 進士 秀明

茨城県つくば市東1丁目1番3号 工業技
術院生命工学工業技術研究所内

(72) 発明者 太田 賢

茨城県つくば市東1丁目1番3号 工業技
術院生命工学工業技術研究所内

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 遺伝子の転写を抑制する機能を有するペプチド

(57) 【要約】 (修正有)

【課題】 DNAに結合し遺伝子の転写を抑制する機能を有する高等植物由来のペプチド、該ペプチドをコードする遺伝子、該遺伝子を含有する組み換えベクター及び該組み換えベクターを含む形質転換体を提供する。

【解決手段】 (a) 特定のアミノ酸配列からなるペプチド、又は (b) アミノ酸配列 (a) において1若しくは数個のアミノ酸が欠失、置換若しくは付加されたアミノ酸配列からなる遺伝子の転写を抑制する機能を有するペプチド。

【特許請求の範囲】

【請求項 1】 (a) 配列番号 1 で表されるアミノ酸配列からなるペプチド、又は (b) アミノ酸配列 (a) において 1 若しくは数個のアミノ酸が欠失、置換若しくは付加されたアミノ酸配列からなる遺伝子の転写を抑制する機能を有するペプチド。

【請求項 2】 (a) 配列番号 2 で表されるアミノ酸配列からなるペプチド、又は (b) アミノ酸配列 (a) において 1 若しくは数個のアミノ酸が欠失、置換若しくは付加されたアミノ酸配列からなる遺伝子の転写を抑制する機能を有するペプチド。

【請求項 3】 請求項 1 又は 2 に記載のペプチドをコードする遺伝子。

【請求項 4】 請求項 3 に記載の遺伝子を含有する組み換えベクター。

【請求項 5】 請求項 4 に記載の組み換えベクターを含む形質転換体。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】 本発明は、遺伝子の転写を抑制する機能を有するペプチド、該ペプチドをコードする遺伝子、該遺伝子を含有する組み換えベクター及び該組み換えベクターを含む形質転換体に関する。

【0002】

【従来の技術】 植物ホルモン、エチレンに応答するシス制御エレメントに結合するタンパク質因子 ERF (Ethylene Responsive Element binding Factor) は、ERF ドメインと名付けた DNA 結合ドメインを有する植物特有の転写因子である。最近の研究から、ERF タンパク質をコードする遺伝子は、マルチジーンファミリーを構成していることが明らかになっている。これまでに、タバコ、シロイヌナズナ植物から ERF ドメインを有するタンパク質因子をコードする cDNA が明らかにされているが、本発明者らはさらに、タバコ、イネ、シロイヌナズナの cDNA について機能解析を行い、植物細胞内でリプレッサーとして機能するドメインを明らかにし、本発明を完成した。

【0003】

【発明が解決しようとする課題】 すなわち、本発明は DNA に結合し遺伝子の転写を抑制する機能を有する高等植物由来のペプチド、該ペプチドをコードする遺伝子、該遺伝子を含有する組み換えベクター及び該組み換えベクターを含む形質転換体を提供することを目的とする。

【0004】

【課題を解決するための手段】 本発明者らは、タバコ、イネ、シロイヌナズナの cDNA について機能解析を行った結果、ERF 因子のカルボキシ末端領域のアスパラギン酸-ロイシン-アスパラギン (DLN) からなるモチーフを有する領域が、遺伝子の転写を抑制する機能を有することを発見し、本発明を完成した。このような D

LNモチーフを有し遺伝子の転写を抑制する機能を有するペプチドとしては、例えばタバコ由来の ERF3 に含まれるペプチド：シロイヌナズナ由来の AtERF3、AtERF4、AtERF7 及び AtERF8 (配列番号 1) に含まれるペプチド：イネ由来の OsERF3 に含まれるペプチドが挙げられる。

【0005】

【発明の実施の形態】 機能解析の方法は、それぞれの ERF 因子をコードしている cDNA から、タンパク質コード領域を切り出し、これを酵母の GAL4 転写因子の DNA 結合ドメインをコードしている領域と結合し、さらに植物細胞で機能するカリフラワーモザイクウイルス 35S プロモーターの下流につないでエフェクタープラスミドを構築する。これを GAL4 タンパク質結合部位をプロモーター領域に結合した、ルシフェラーゼ遺伝子からなるリポーター遺伝子と同時に、タバコ培養細胞にエレクトロポーション法により導入し、リポーター遺伝子であるルシフェラーゼ遺伝子の活性を測定することによって調べた。

【0006】 つぎに、リプレッサー因子に存在するリプレッサー機能を有する領域であるリプレッサードメインを同定するために、各遺伝子のコード領域を削除する方法であるディリーション解析法を用いて、ERF 因子のどの領域にリプレッサードメインが存在するのかを調べた。

【0007】

【実施例】 アラビドプシス (和名シロイヌナズナ) AtERF8 遺伝子の単離

(プローブの作成) すでに塩基配列が決定されているタバコの ERF3 遺伝子の cDNA をクローニングしたプラスミド pERF3 を制限酵素 EcoRI と NotI で消化し、アガロースゲル電気泳動で ERF3 の cDNA を含む 950bp の DNA 断片を単離した。この DNA 断片約 50ng を 100°C で 10 分変性した後、DNA ラベリングキット (アマシャムファルマシア社製 Ready-To-Go DNA Labelling Beads) と 5μL のアルファ 32P-dCTP (アマシャムファルマシア社 AA0005) をもちいて標識し、プローブを作成した。

【0008】 (cDNA の作成とスクリーニング) アラビドプシス植物体から葉を採取し、液体窒素中でミキサーを用いて粉状に粉砕する。この粉砕した葉粉末 10g に対し 20mL の RNA 抽出バッファー (8M 塩酸グアニジン、20mM エチレンジアミン四酢酸二ナトリウム (EDTA)、20mM 2-(N-モルホリノ) エタンスルホン酸 (MES)、50mM メルカプトエタノール) と 8mL の TE 溶液 (10mM Tris-Cl pH8.0, 1mM EDTA) で飽和したフェノールと 2mL のクロロホルムを加えよく攪拌し、遠心 (10000g) して上清を回収する。上清に対して 0.2 倍容量の 1M 酢酸と 0.7 倍容量のエタノールを加え -20°C で静置した後、遠心 (10000g) する。沈殿を 2mL の TE 溶液に溶解し、500mL の 10M 塩化リチウム溶液を加え、0

℃で2時間静置し、遠心する。沈殿を70%のアルコールで洗浄した後、風乾し、全RNA標品を得た。この全RNAをプロメガ社製Poly A Tract System 1000を用いて全RNAからmRNAのみを精製した。このmRNAを鋳型としてファルマシア社製cDNAダイレクションクローニングキットを用いて二本鎖cDNAを合成。これらをファルマシア社のプロトコルに従ってラムダgt11発現ベクターのEcoRI-NoI制限酵素サイトに組み込んだのち、ラムダパッケージングキット（ファルマシア社）を用いてライブラリーを完成させた。

【0009】作成したアラビドプシスcDNAライブラリーを組み込んだラムダファージがプレート（10cmx14cm）一枚につき約4万個のプラークが得られる容量を、予め0.5ccmLの10mMの硫酸マグネシウム溶液で懸濁しておいた大腸菌1090株に懸濁して感染させ、選択するための薬剤である50mg/Lのアンピシリン酸ナトリウムLB寒天培地（1Lに対して10gトリプトン、10g塩化ナトリウム、5gイーストイクトラクト、15g寒天）に展開し、37℃で培養する。プラークが約2mmになった時点でニトロセルロース膜（S&S社製）に写し取り、変性液（0.2M NaOH, 1.5M NaCl）に浸した濾紙（ワットマン3MM）上に5分、中和液（0.4M Tris-HCl, pH7.5, 2xSSC（150mM NaCl, 15mM クエン酸ナトリウム））に浸した濾紙上で5分間静置した後、2xSSC溶液に5分間浸し、濾紙上で20分間風乾する。80℃で120分乾燥させ、プラークDNAをニトロセルロース膜に固定する。

【0010】ニトロセルロース膜（10cmx14cm）1枚につき2mLのハイブリダイゼーションバッファー（6xSSC, 0.05% skim milk）に浸し60℃で2時間保温した後、100℃10分間加温し、急冷によって変性させたERF3のプロープを含む新しいバッファーと交換し、60℃で12時間保温した。その後、フィルター1枚につき5mLの0.1%のSDS（ドデシル硫酸ナトリウム）を含む2xSSC溶液で15分、0.1%のSDSを含む0.5xSSCで15分、0.1%のSDSを含む0.2xSSCで15分洗浄し、X線フィルムに感光させた。ERF3のプロープが結合したプラークを寒天プレートから単離し、1mLのファージバッファー（10mM Tris-HCl pH7.5, 10mM MgSO4）に懸濁し、ファージを回収した後、上記のスクリーニングを3回繰り返して、単一プラークを得た。このプラークを再び大腸菌に感染させ増幅して、ファージよりDNAを抽出し、cDNA領域を制限酵素EcoRIとNotIを用いて切り出した。このDNA断片をプラスミドpT7D3（ファルマシア社）の制限酵素EcoRI-NotI部位に組み込み、プラスミド塩基配列の解析をおこなった。配列番号1に示すAtERF8のcDNAの全長配列を持つプラスミドをpAtERF8と名付けた。

【0011】AtERF8リプレッションドメインの同定エフェクタープラスミドの構築

（AtERF8全長を含むエフェクタープラスミドpGAL4DB-AtERF8の構築：図1）クローンテック社製（Clontech社、U

SA）のプラスミドpBI221を制限酵素XhoIとSacIで切断し、T4ポリメラーゼで平滑末端処理した後、アガロースゲル電気泳動でGUS遺伝子を除き、カリフラワーモザイクウイルス35Sプロモーター（以下CaMV35S）とノパリン合成酵素遺伝子の転写終止領域（Nosターミネーター、以下Nos-ter）を含む35S-Nosプラスミド断片DNAを得た。クローンテック社製のpAS2-1ベクターを制限酵素HindIIIで消化し、酵母 GAL4タンパク質のDNA 結合領域（1-147 アミノ酸残基）をコードする 748 bp の DNA 断片（以下GAL4DBD）をアガロースゲル電気泳動によって単離した後、T4 DNAポリメラーゼで平滑末端処理をした。このGAL4DBDを含むDNA断片を、先ほどの35S-NosのDNAの35SプロモーターとNosターミネーター間の平滑末端にした部位に挿入し、35Sプロモーターに対して酵母 GAL4 タンパク質のDNA 結合領域の ORF が順方向に並んでいるものを選抜してp35S-GAL4DBD ベクターを構築した。

【0012】AtERF8のcDNAプラスミドpAtERF8とGAL4DBDと読み枠（フレーム）が一致するように設計した5'末アッパープライマーprimer1（配列番号3：AtERF8塩基配列1-20に結合）GATGCCCAACATCACCATGGGと制限酵素SalI部位を持つ3'末ローワープライマーprimer2（配列番号4：AtERF8塩基配列532-558に結合）GTCGACGTATTCGCGCGAGGAGCTAAGTTAAGを用いてAtERF8全タンパク質コード領域（配列番号1：AtERF8塩基配列1-558；アミノ酸配列1-185）をPCR法によって増幅し、DNA断片を得た。PCR反応の条件は、変性反応94℃1分、アニール反応47℃2分、伸長反応74℃1分を1サイクルとして25サイクルおこなった。以下全てのPCR反応は同じ条件でおこなった。得たDNA断片を制限酵素SalIで消化した後、アガロース電気泳動によって目的とするDNA断片を単離した。このAtERF8をコードするDNA断片を、制限酵素SmaIとSalIで予め消化しておいた35S-GAL4DBDプラスミドに組み込み、エフェクタープラスミドpGAL-AtERF8を構築した。このエフェクタープラスミドpGAL-AtERF8を構築する手順を図1に示した。

【0013】（AtERF8アミノ酸141/185を含むエフェクタープラスミドpGAL-141/185AtERF8の構築）pAtERF8プラスミドとGAL4DBDをコードするフレームと読み枠が一致するように設計した5'末アッパープライマーprimer3（配列番号5：結合部位AtERF8塩基配列420-440）GCGACGTATCCAAAGATGACと制限酵素SalI部位を持つ3'末ローワープライマーprimer2（配列番号4：結合部位AtERF8塩基配列532-558）を用いてAtERF8のアミノ酸配列141/185コード領域に該当する塩基配列420-558の領域を含むDNA断片をPCR法によって得た。このDNA断片を制限酵素SalIで消化し、アガロース電気泳動によって目的とするDNA断片を単離した。このAtERF8のアミノ酸配列166/225にコードするDNA断片（DNA領域420-558）を、制限酵素SmaIとSalIで予め消化しておいた35S-GAL4DBDプラスミドに組み込み、エフェクタープラスミドpGAL-141/185AtERF8

を構築した。

【0014】(レポーター遺伝子の構築：図2及び図3) プラスミドpUC18を制限酵素EcoRIとSstIで消化する。pBI221(クローンテック社)を制限酵素EcoRIとSstIで消化し、Nos-ter(nopaline synthase terminator)を領域含む270bpのDNA断片を挿入するアガロースゲル電気泳動によって単離する。得られた断片を制限酵素EcoRIとSstIで消化しておいたプラスミドpUC18のEcoRI-SstI部位に挿入する。カリフラワーモザイクウイルス35SプロモーターTATAボックスを含む相補鎖のDNA 1

(配列番号6) AGCTTAGATCTGCAAGACCTTCCTCTATATAAGGAAGTTCATTTCATTGGAGAGGACACGCTG及びDNA 2(配列番号7) GATCCAGCGTGTCTCTCCAAATGAAATGAACCTTCCTTATAGAGGAAGGCTCTTGCGATCTAを合成する。合成したDNAを90℃2分加熱した後、60℃で1時間加熱し、その後室温(25℃)で2時間静置してアニーリングさせ2本鎖を形成させる。Nos-terを持つpUC18プラスミドを制限酵素HindIIIとBamHIで消化する。合成した2本鎖DNAをpUC18のHindIII-BamHI部位に挿入し、TATA-boxとNos-terを含むプラスミドを構築する。上記の手順は、図2に示した。

【0015】このプラスミドを制限酵素SstIで消化し、T4 DNAポリメラーゼで平滑末端処理をおこなう。ホタル・ルシフェラーゼ遺伝子(LUC)をもつプラスミドベクターPGV-CS2(東洋インキ社製)を制限酵素XbaIとNcoIで消化し、T4 DNAポリメラーゼで平滑末端処理をおこなった後、アガロースゲル電気泳動によって、ルシフェラーゼ遺伝子を含む1.65 kbのDNA断片を単離精製した。このDNA断片を上記のTATAボックスとNosターミネーターを含むプラスミドに挿入しTATA-LUCリポーター遺伝子を構築した。酵母のGAL4タンパク質のDNA結合配列を5コピー持つプラスミドpG5CAT(Clontech社製)を制限酵素SmaIとXbaIで消化し、T4 DNAポリメラーゼで平滑末端処理をおこなった後、5コピーのGAL4タンパク質のDNA結合配列を含むDNA断片をアガロースゲル電気泳動で精製した。TATA-LUCベクターを制限酵素BglIIで消化し、T4 DNAポリメラーゼで平滑末端処理をおこなう。この部位に平滑末端化した5コピーのGAL4タンパク質のDNA結合配列を含むDNA断片を挿入し、得られたプラスミドのうちGAL4タンパク質のDNA結合配列が順方向に向いているものを選抜し、リポーター遺伝子GAL4-LUCを構築した。

【0016】(リファレンス遺伝子の構築) ウミシイタケ由来のルシフェラーゼ遺伝子をもつプロメガ社製カセットベクターpRL-nuIIを制限酵素NheIとXbaI制限酵素で切断し、T4 DNAポリメラーゼで平滑末端処理を行った後、アガロースゲル電気泳動でウミシイタケ・ルシフェラーゼ遺伝子を含む948 bpのDNA断片を精製する。このDNA断片をエフェクタープラスミドの構築の際に用いたGUS遺伝子を除いたpBI221ベクターのGUS

遺伝子があった領域に挿入する。得られたプラスミドのうち、ウミシイタケ・ルシフェラーゼ遺伝子が順方向に向いているものを選抜する(pPTRLの構築)。

【0017】レポーター遺伝子の活性測定法
タバコ培養細胞プロトプラストにリポーター遺伝子とエフェクタープラスミドをエレクトロポレーション法を用いて導入し、エフェクターの効果をリポーター遺伝子の活性を測定することによって調べた。

(プロトプラストの調製法) 100 mLのMS培地(ムラシゲ・スコーグ培地用混合塩類、日本製薬社製、3%シヨ糖、0.2 g/L KH₂PO₄、0.2 g/L m-inositol、2 mg/L g lycine、1 mg/L 塩酸チアミン、0.2 mg/L 2, 4-D、pHを5.8に調節する)に7日間培養したタバコ培養細胞BY-2の前培養液3 mLを加えて26℃で3日間暗所で培養した細胞を金属製のメッシュ(目の開きが125 mm、東京スクリーン社製)濾過回収し、0.4 M マニトールを含むMS培地で細胞を洗浄する。洗浄した細胞を25 mLの0.4 M マニトールを含むMS培地に懸濁して10分間室温で放置3,000 rpmで1分間遠心して細胞を回収する。この細胞を20 mLの1%セルラーゼ(オノヅカRS、)と0.1%ペクトリアーゼY-23(セイシン社製)を含むMS培地に細胞を再懸濁して、26℃で90分間暗所で60 rpmで回転振とうしながら細胞壁を消化する。その後、1,000 rpmで5分間遠心してプロトプラストを回収する。

【0018】(エレクトロポレーションによる遺伝子導入) 上記で得たプロトプラストを濃度が 2.5×10^6 細胞/mLになるようにエレクトロポレーション緩衝液(5 mM MES pH5.8、70 mM KCl、0.3 M マニトール)に再懸濁する。エレクトロポレーション用キュベット(ジーンパルサーキュベット0.4 cm electrode、バイオラッド社製)に構築したpGAL4-LUCレポーター遺伝子とエフェクタープラスミドとしてpGALDB-AtERF8あるいはそのデレクションシリーズ(pGALDB-1/25AtERF8~pGALDB-204-225AtERF8)のDNAを各10 µgとリファレンス遺伝子プラスミド1 µgを100 µLの2Xエレクトロポレーション緩衝液(10 mM MES pH5.8、140 mM KCl、0.6 M マニトール)を加えて、滅菌水で全量を200 µLにする。キュベットに600 µLのプロトプラスト懸濁液を入れて、エレクトロポレーター(Genepulser II Electroporation System、バイオラッド社製)を用いて600 V、25 mFの条件でDNAを導入する。導入後、キュベットからプロトプラストを1,000 rpmで5分間遠心して回収し、5 mLの0.4 M マニトールを含むMS培地にプロトプラストを再懸濁して、26℃で6時間暗所で静置した後、レポーター遺伝子の活性を測定した。

【0019】(ルシフェラーゼ活性測定) 6時間静置したプロトプラスト懸濁液を1 mL採取して、2,000 rpmで3分間遠心してプロトプラストを回収した後、Dual-Luciferase™ Reporter Assay System (Promega社製)

に添付されている Passive Lysis Buffer 50 μ L に懸濁する。プロトプラストを破碎した後、遠心して上清を回収する。この細胞抽出液を5 μ L 用いて Dual-LuciferaseTMReporter Assay System (Promega 社製)とルミネセンスリーダー (BLR-201, アロカ社製)を用いてルシフェラーゼ活性測定を行なった。ホタル・ルシフェラーゼおよびウミシイタケ・ルシフェラーゼ活性の測定を測定キットの説明書に従って 10 秒間の発光を積分モードでカウントした。リファレンス遺伝子の活性値をリポーター遺伝子の活性値で割り、その相対値である Relative luciferase activityを測定値として求めた。エフェクターを入れない場合の相対値を100として、エフェクタープラスミドを同時に細胞に導入したときにリポーター遺伝子の活性値の変動によってエフェクターの効果进行调查した。すなわち、pGAL4-LUCレポーター遺伝子とpGALDB-AtERF8エフェクタープラスミドを導入したときのリポーターの活性値が減少となることから、pGALDB-AtERF8は、レポーター遺伝子の活性を抑制する効果

(リプレッサー機能)があることを示している。以下、リポーターの活性値を測定して、リポーターの相対活性値が100以下になる場合に、導入したエフェクターにはリプレッサー機能が存在するので、どのエフェクターがリプレッサーとして機能するのかをレポーターの活性を測定することによって調べた。

【0020】(リプレッサードメインの同定)アラビドプシスAtERF8の遺伝子の転写制御に関わる機能を解析するため、リポーター遺伝子pGAL4-LUCとpGALDB-AtERF8をタバコ培養細胞より調整したプロトプラストにエレクトロポレーション法によって導入し、リポーター遺伝子の活性を調べた。その結果、pGAL-AtERF8エフェクターは、リポーター遺伝子の活性をエフェクターを導入しないリポーター遺伝子の場合(コントロール)に比べ70%に減少させた。対照実験としておこなったAtERF8のコード領域を含まないp35S-GALDBDは、リポーター遺

SEQUENCE LISTING

<:110>:Secretary of Agency of Industrial Science and Technology

<:120>:Novel repression domain of plant specific transcription factor

<:130>:

<:160>: 7

<:210>: 1

<:211>: 558

<:212>: DNA

<:213>: Arabidopsis thaliana

<:400>:1

伝子の活性に影響を及ぼさなかった。このことは、AtERF8が転写を抑制するリプレッサーとして機能していることを示している。

【0021】次に、AtERF8遺伝子のタンパク質コード領域をディリーションしたDAN断片もつエフェクタープラスミド、pGAL-141/185AtERF8が、リポーター遺伝子の活性を抑制する機能をもつかを調べた。pGAL-141/185AtERF8エフェクタープラスミドをリポーター遺伝子と共にタバコ培養細胞に導入し、リポーター遺伝子の活性を測定した結果、pGAL-141/185AtERF8エフェクターは、pGALDB-AtERF8を導入した場合と同様に、レポーター遺伝子の活性をコントロールに比べ、約45%に抑えるリプレッサー機能があることが示された。(図4B)。この結果から、AtERF8のリプレッサー機能を持つ領域(リプレッションドメイン)は、AtERF8のアミノ酸配列、141/185に存在することを明らかにした(図4B)。このアミノ酸配列を配列番号2に示した。

【0022】本発明の遺伝子の転写を抑制する機能を有するペプチドは、例えばガン遺伝子の転写調節領域に特異的に結合するDNA結合タンパク質と融合させて、細胞内で発現させることにより、ガン遺伝子の発現を効率的に抑制することが可能となる。また、リプレッサー機能は調べたところ遺伝子に非特異的であるが、DNAとの結合が必要であることから、特定のDNAに結合するDNA結合ドメインと融合することにより、遺伝子特異的あるいは非特異的に転写を抑制することが可能となる。このことによって、例えば色素代謝系の酵素をコードする遺伝子の発現を制御することが可能となり、これまでには得られなかった色違いの花弁を有する花を創作することができる。また、アレルゲンとなるタンパク質の発現を抑制することによって、アレルゲンの少ない食物の生産も可能となる。

【0023】

【配列表】

atg ccc aac atc acc atg ggt ttg aaa ccc gac ccg gtt gct cca acg 48
 Met Pro Asn Ile Thr Met Gly Leu Lys Pro Asp Pro Val Ala Pro Thr
 5 10 15

aac ccg act cat cat gag agt aat gct gcc aaa gag att cgt tac aga 96
 Asn Pro Thr His His Glu Ser Asn Ala Ala Lys Glu Ile Arg Tyr Arg
 20 25 30

ggc gtt agg aaa cgt cca tgg gga aga tac gcc gct gag atc cga gat 144
 Gly Val Arg Lys Arg Pro Trp Gly Arg Tyr Ala Ala Glu Ile Arg Asp
 35 40 45

ccg gtt aag aaa act cga gtc tgg ctc ggt acg ttc gac acc gct cag 192
 Pro Val Lys Lys Thr Arg Val Trp Leu Gly Thr Phe Asp Thr Ala Gln
 50 55 60

cag gcg gcg cgt gct tac gac gca gcc gcg cgt gac ttt cgt ggt gtt 240
 Gln Ala Ala Arg Ala Tyr Asp Ala Ala Ala Arg Asp Phe Arg Gly Val
 65 70 75 80

aag gct aag acc aat ttc ggt gtt atc gtt ggt agt agt cct act cag 288
 Lys Ala Lys Thr Asn Phe Gly Val Ile Val Gly Ser Ser Pro Thr Gln
 85 90 95

agt agc acc gtc gtc gac tct ccc acg gcg gca cgg ttt ata aca cct 336
 Ser Ser Thr Val Val Asp Ser Pro Thr Ala Ala Arg Phe Ile Thr Pro
 100 105 110

ccg cac ctc gag ctc agc tta ggc ggc ggc ggc gcg tgt cgt cgt aag 384
 Pro His Leu Glu Leu Ser Leu Gly Gly Gly Gly Ala Cys Arg Arg Lys
 115 120 125

atc ccg ctt gtg cat ccg gtt tac tac tat aac atg gcg acg tat cca 432
 Ile Pro Leu Val His Pro Val Tyr Tyr Tyr Asn Met Ala Thr Tyr Pro
 130 135 140

aag atg acg acg tgt ggt gtc cag agc gag tct gaa acg tcg tcg gtc 480
 Lys Met Thr Thr Cys Gly Val Gln Ser Glu Ser Glu Thr Ser Ser Val
 145 150 155 160

gtt gat ttc gaa ggt gga gct ggg aag ata tct ccg ccg tta gat ctg 528
 Val Asp Phe Glu Gly Gly Ala Gly Lys Ile Ser Pro Pro Leu Asp Leu
 165 170 175

gat ctt aac tta gct cct ccg gcg gaa tag 558
 Asp Leu Asn Leu Ala Pro Pro Ala Glu
 180 185

<:211>: 45
<:212>: RPT
<:213>: Arabidopsis thaliana

<:400>: 2
Ala Thr Tyr Pro Lys Met Thr Thr Cys Gly Val Gln Ser Glu Ser Glu
 5 10 15
Thr Ser Ser Val Val Asp Phe Glu Gly Gly Ala Gly Lys Ile Ser Pro
 20 25 30
Pro Leu Asp Leu Asp Leu Asn Leu Ala Pro Pro Ala Glu
 35 40 45

<:210>: 3
<:211>: 21
<:212>: DNA
<:213>: Artificial Sequence

<:223>: Description of Artificial Sequence: Synthetic primer DNA

<:400>: 3
gatgcccaac atcaccatgg g

<:210>: 4
<:211>: 33
<:212>: DNA
<:213>: Artificial Sequence

<:223>: Description of Artificial Sequence: Synthetic primer DNA

<:400>: 4
gtcgacctat tccgccggag gagctaagtt aag

<:210>: 5
<:211>: 20
<:212>: DNA
<:213>: Artificial Sequence

<:223>: Description of Artificial Sequence: Synthetic primer DNA

<:400>: 5
gcgacgtatc caaagatgac

<:210>: 6
<:211>: 65
<:212>: DNA
<:213>: Artificial Sequence

<:223>: Description of Artificial Sequence: Synthetic primer DNA

<:400>: 6
agcttagatc tgcaagacct ttccctctata taaggaagtt catttcattt ggagaggaca


```

      10      20      30      40      50      60
cgctg
  65

<:210>: 7
<:211>:
<:212>: DNA
<:213>: Artificial Sequence

<:223>: Description of Artificial Sequence: Synthetic primer DNA

<:400>: 7
gatccagcgt gtcctctcca aatgaaatga acttccttat atagaggaag ggtccttgacg
      10      20      30      40      50      60
atcta
  65

```

【図面の簡単な説明】

【図 1】 プラスミド pBI221 から pGALDB-AtERF8 を構築する手順を示す図である。

【図 2】 レポーター遺伝子 GAL4-LUC を構築する手順の前半部を示す図である。

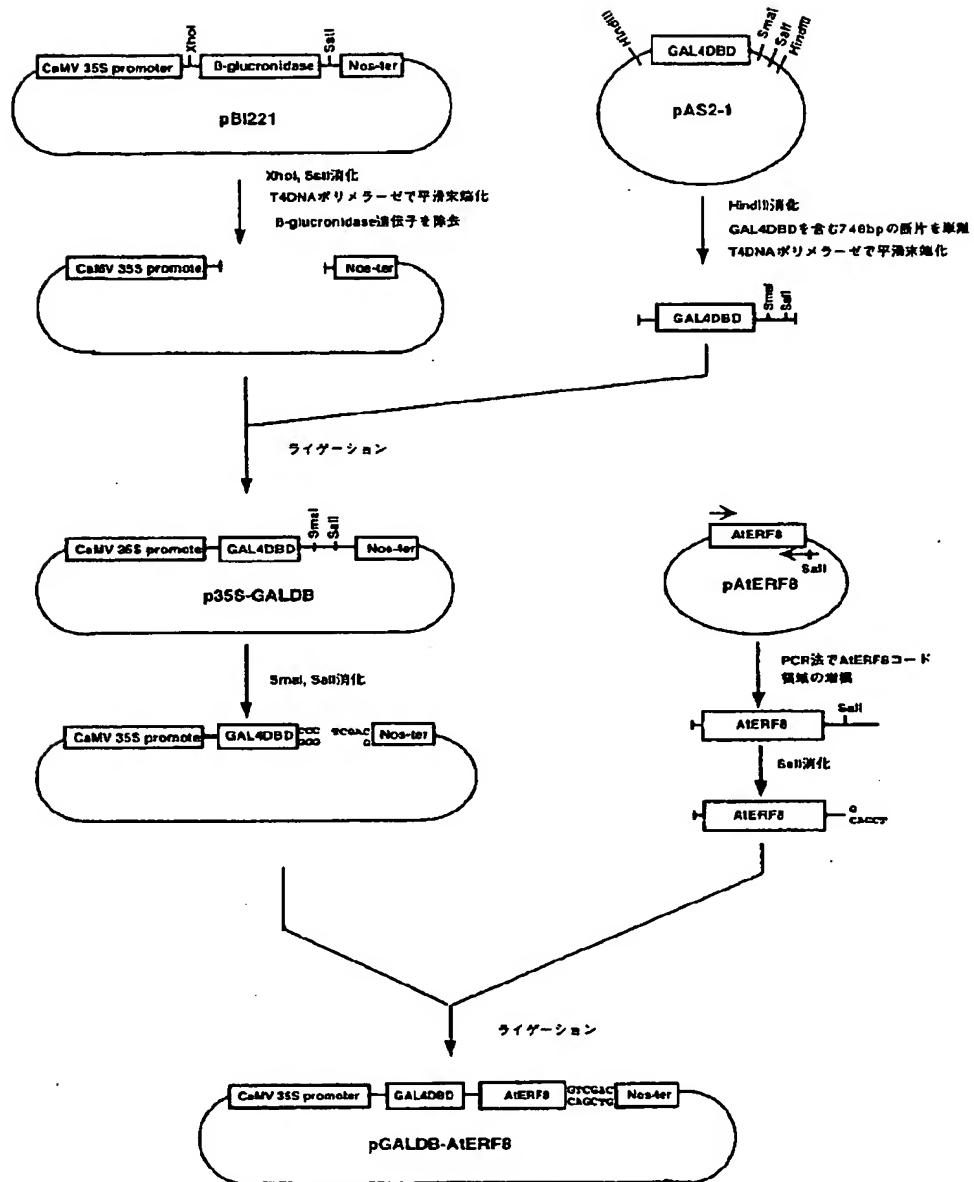
【図 3】 図 2 に引き続きレポーター遺伝子 GAL4-LUC を構築する手順の後半部を示す図である。

【図 4】 A はリポーター遺伝子とエフェクタープラスミドを示す図である。図において、5XGAL4: GAL4 転写因子 DNA 結合配列、TATA: CaMV35S プロモーター-TATA ボックスを含む領域、LUC: ルシフェラーゼ遺伝子、CaMV 35S: カリフラワーモザイクウイルス 35S タンパク質遺伝子プロモーター、GAL4 DB: 酵母 GAL4 転写因子 DNA 結合ドメイン

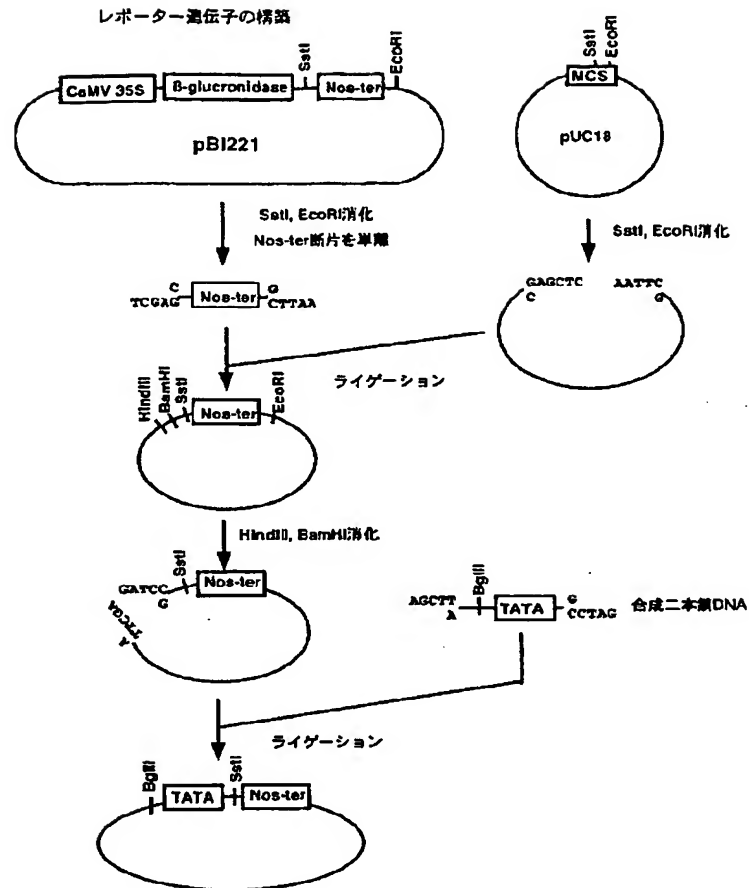
ンコード領域、Nos: ノバリン合成酵素遺伝子転写終止領域を表す。B は AtERF8 および AtERF8 のディリーションがリポーター遺伝子の活性 (Relative Activity) に及ぼす影響を示す図である。図において、左の数字 (141/185) は、AtERF8 のアミノ酸領域を示す。真ん中のボックスは左の数字に該当するアミノ酸配列領域を示す。右のグラフは、左の領域をもつエフェクタープラスミドを導入したときのリポーター遺伝子の活性を示す。エフェクターを入れないときのリポーター遺伝子の活性を 100 とした。AtERF8 および AtERF8 ディリーションのエフェクターでアミノ酸配列 141/185 を持つエフェクターがリポーター遺伝子の活性を 45% に減少させ、転写を抑制する効果を持つことが示されている。

【図1】

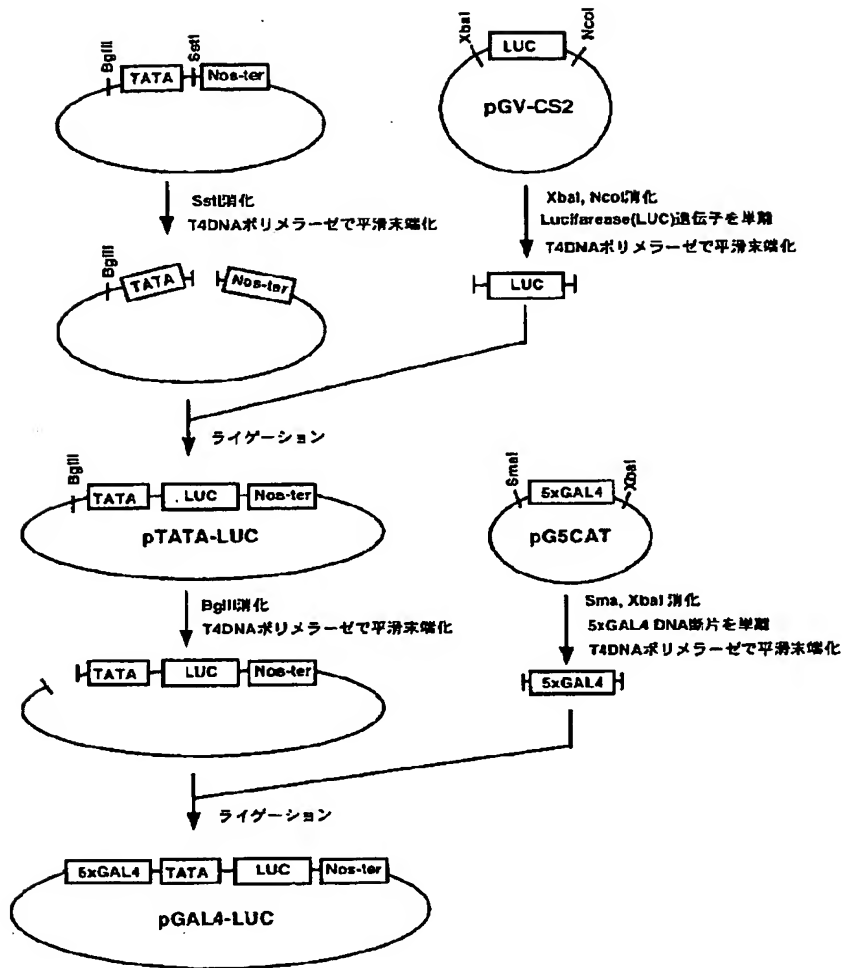
エフェクタープラスミドの構築



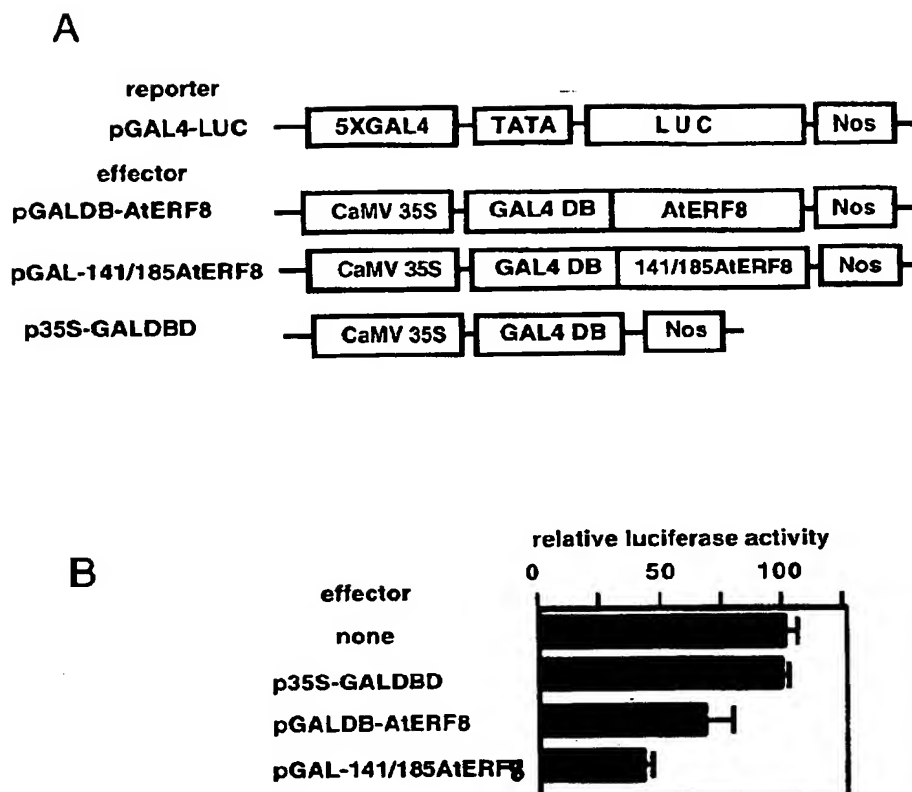
【図2】



【図3】



【図4】



フロントページの続き

Fターム(参考) 4B024 AA08 AA20 BA80 CA04 CA07
CA09 CA20 DA01 EA04 FA02
FA07 GA14 GA17 GA21 HA13
HA14
4B065 AA72Y AA88X AA88Y AB01
AC14 AC20 BA03 BA10 BB01
BC01 BD01 BD50 CA24 CA46
CA53
4H045 AA10 AA20 BA41 CA30 EA05
EA50 FA74

**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning
Operations and is not part of the Official Record**

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

- ☐ BLACK BORDERS
- ☐ IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES
- ☐ FADED TEXT OR DRAWING
- ☒ BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING
- ☐ SKEWED/SLANTED IMAGES
- ☐ COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS
- ☐ GRAY SCALE DOCUMENTS
- ☐ LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT
- ☐ REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY
- ☐ OTHER: _____

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.